

VERIFICATION OF A TRANSLATION
(VERIFICATION D'UNE TRADUCTION)

10971 U.S. PRO
09/918485
08/01/01

I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below :

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application n° PCT/FR 8800292 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true ; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date December 4, 1989

Full name of the translator JARVIS DERA
(Nom et prénom du traducteur)

Signature of the translator Dent Jarvis
(Signature du traducteur)

Post Office Address (Adresse postale) ... 7 rue d'URSEL ...
... 67000 STRASBOURG ...

RECEIVED

filed
12/11/89

6/5/95

1
SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES
DOTES D'UNE ACTIVITE LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERE

L'invention a pour objet des séquences de
nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une
activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

Elle vise plus spécialement des moyens, en
particulier des séquences nucléotidiques, des polypep-
tides ou encore des vecteurs, ou des souches bacté-
riennes, modifiés par ces séquences et exprimant des
polypeptides permettant de préparer des compositions
larvicides actives vis-à-vis de lépidoptères, de
préférence vis-à-vis de Spodoptera littoralis (ci-après
S. littoralis) ou Mamestra brassicae (ci-après désignée
par M. brassicae) ou capables de transformer les plantes à
traiter en leur conférant ce type d'activité.

On sait que la plupart des isolats de
B. thuringiensis présentent une activité toxique à l'égard
de larves de plus de cent espèces de lépidoptères.

Cette activité résulte, de la capacité des
souches de B. thuringiensis à synthétiser, au moment de la
sporulation, des inclusions cristallines de nature
protéique, ou δ -endotoxines, sous le contrôle d'un ou
plusieurs types de gènes.

On a montré que l'activité de ces polypeptides
est contenue dans la moitié NH_2 -terminale ou N-terminale
de la protéine.

Les travaux réalisés ont montré la spécificité
élevée des δ -endotoxines vis-à-vis de larves d'une espèce
donnée.

En raison de cette spécificité élevée, de nom-
breuses espèces de lépidoptères, notamment de la famille
des Noctuelles, ne réagissent que faiblement aux prépara-
tions commerciales de B. thuringiensis disponibles.

Il en est ainsi en particulier de l'espèce

decd
12/1/85

U.S. PTO
09/918485



S.littoralis, insecte polyphage qui constitue le principal parasite du coton et d'autres cultures industriellement importantes. Parmi ces cultures, on citera le maïs, le ricin, le tabac, l'arachide, des plantes fourragères, telles que le trèfle ou la luzerne, ou encore des produits maraîchers comme le chou ou la tomate.

On conçoit donc l'intérêt de disposer de moyens ciblant spécifiquement et efficacement la famille des Noctuelles et notamment S.littoralis ou M.brassicae.

Les gènes de δ -endotoxines identifiés à ce jour, ne codent pas pour un polypeptide actif préférentiellement à l'égard de S.littoralis.

La recherche par les inventeurs d'une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide actif de préférence vis-à-vis des Noctuelles, plus spécialement vis-à-vis de S.littoralis, les a conduits à étudier les isolats naturels de deux souches de B.thuringiensis dont l'activité larvicide sur S.littoralis apparaît plus élevée que celle des préparations industrielles faites à partir d'autres souches de B.thuringiensis.

Il s'agit des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01.

L'étude de ces isolats a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs gènes de δ -endotoxines de structures différentes et de spécificités différentes, dont deux gènes préférentiellement actifs contre P.brassicae mais peu actifs vis-à-vis de la Noctuelle du coton et un gène inactif vis-à-vis de P.brassicae et de S.littoralis.

En étudiant l'ADN total de ces isolats et en effectuant des hybridations appropriées, suivies du clonage des fragments identifiés par hybridation, les inventeurs ont constaté qu'il est possible d'isoler des séquences nucléotidiques impliquées dans des gènes de δ -endotoxines codant pour des polypeptides actifs, de

préférence contre S. littoralis.

L'invention a donc pour but de fournir des séquences nucléotidiques capables de coder pour au moins la partie NH₂-terminale d'une δ -endotoxine toxique contre les Noctuelles, de préférence contre S. littoralis ou M. brassicae.

Elle a également pour but de fournir un polypeptide toxique à l'égard des Noctuelles.

L'invention vise en outre un procédé d'obtention d'une telle séquence et d'un polypeptide présentant l'activité recherchée ainsi que les moyens intermédiaires tels que vecteurs et souches bactériennes utilisables pour l'obtention du polypeptide.

L'invention vise de plus les applications de ces séquences et polypeptides pour l'élaboration de compositions larvicides à l'égard des Noctuelles, en particulier de S. littoralis et pour la transformation des plantes susceptibles d'être infectées par ces larves.

L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de façon spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S. littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S. littoralis.

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle est portée par une séquence de nucléotides d'environ 3kb telle qu'obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences de nucléotides de B. thuringiensis capables de s'hybrider avec des sondes 1, 2 et 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2. Le fragment de 3kb correspond plus spécialement au fragment de restriction HindIII-PstI.

Les séquences de nucléotides de l'invention

sont, en outre, caractérisées en ce qu'elles comportent des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII KpnI - HindIII - PstI.

De manière préférée, ces séquences de nucléotides sont obtenues par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN provenant d'au moins une souche de B.thuringiensis. Dans une variante de réalisation de l'invention, deux souches différentes de B.thuringiensis sont mises en oeuvre.

Des souches de B.thuringiensis particulièrement appropriées pour l'obtention de ces séquences de nucléotides sont les souches correspondant à aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, déposées le 21 Avril 1987 respectivement sous les n° 1-661 et n° I-660 à la Collection nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) à Paris.

D'une manière avantageuse, les séquences de nucléotides de l'invention codent pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides présentant l'activité larvicide à l'égard de S.littoralis.

Une séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

30

35

GTC ⁵²TAC TTG ACA GGG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA
 TAT GGG GCA TAT ATT GAT ATT ¹¹²TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT
 TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA TCG ¹⁷²TGG
 TAA TGA AAA ACA GTA ²³²TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA
 ATA AAA AAA CGG AGG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT
 CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT ²⁹²CCT GAA GAA GTA
 CTT TTG GAT ³⁵²GGA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT
 GAT ATT TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT
 GTA CCA GGG GGA GGA TTT TTA GTT ⁴¹²GCA TTA ATA GAT TTT GTA
 TGG ⁴⁷²GGA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA
 CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT ⁵³²GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT
 AGG AAT GCT GCT ATT GCT AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT
 TTC AAT ATA TAT GTG GAA GCA TTT AAA GAA TGG GAA GAA ⁵⁹²GAT
 CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA ⁶⁵²GTA ATT GAT CGC TTT
 CGT ATA CTT GAT GGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT ⁷¹²CCT TCG TTT
 CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA TCC GTT TAT GCT
 CAA GCG GCC ⁷⁷²AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA
 ATT TTT GGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ⁸³²ACG ATA AAT GTC AAT
 GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT AGG CAT ATT GAT GAA TAT GCT
 GAT CAC TGT GCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA
 CCG ⁸⁹²AAA TCT ACG TAT CAA GAT ⁹⁵²TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA
 CGG AGA GAC TTA ACA TTG ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC
 TTT CCA AAC TAT GAC

Des séquences de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent l'enchaînement (I) défini ci-dessus.

D'une manière avantageuse, la séquence de nucléotides caractérisée par l'enchaînement défini ci-dessus code pour une partie d'un polypeptide ayant une activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis plus élevée que celle des polypeptides codés par des isolats naturels actuellement connus pour leurs effets vis-à-vis de S.littoralis.

L'étude de cette séquence de nucléotides montre qu'elle est caractérisée par un codon d'initiation ATG situé en position 241 à partir duquel une phase ouverte de lecture de 750 nucléotides a été identifiée.

Cette séquence est également caractérisée par un site d'attachement des ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

Selon un autre aspect, la séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comporte, en amont du codon ATG, une séquence allant du nucléotide en position 137 au nucléotide en position 177, fortement homologue à la région trouvée par Wong et al. (1983) et décrit dans (16) en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) et dont les auteurs ont montré qu'elle contenait trois promoteurs BtI, BtII et Ec qui sont respectivement fonctionnels chez B.thuringiensis et E.coli. L'homologie de ces séquences est d'environ 70%.

L'invention concerne également une séquence de nucléotides codant pour la séquence (II) d'acides aminés suivante :

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN
GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL
LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE
ASP ILE SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE
VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP
GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN
ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG
ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE
ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO
ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP PRG PHE ARG
ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG
ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR ALA GLN
ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE
PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU
ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP
HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO
LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG
ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE
PRO ASN TYR ASP

Une meilleure identification de la séquence de nucléotides isolée des souches ci-dessus, déposées à la CNCM a permis de constater que le nucléotide situé en position 273 est la guanine (G), l'acide aminé résultant du codon GTA étant alors la valine.

Or, la lecture du nucléotide correspondant à cette position 273 dans la demande FR.8708090 du 10 juin 1987 avait conduit à mentionner la thymine (T) et, comme acide aminé résultant du codon TTA, la leucine.

Une autre séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée par sa capacité d'hybridation avec une sonde formée à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

15

20

25

30

35

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100

991
 1001
 1011
 1021
 1031
 1041
 1051
 1061
 1071
 1081
 1091
 1101
 1111
 1121
 1131
 1141
 1151
 1161
 1171
 1181
 1191
 1201
 1211
 1221
 1231
 1241
 1251
 1261
 1271
 1281
 1291
 1301
 1311
 1321
 1331
 1341
 1351
 1361
 1371
 1381
 1391
 1401
 1411
 1421
 1431
 1441
 1451
 1461
 1471
 1481
 1491
 1501
 1511
 1521
 1531
 1541
 1551
 1561
 1571
 1581
 1591
 1601
 1611
 1621
 1631
 1641
 1651
 1661
 1671
 1681
 1691
 1701
 1711
 1721
 1731
 1741
 1751
 1761
 1771
 1781
 1791
 1801
 1811
 1821
 1831
 1841
 1851
 1861
 1871
 1881
 1891
 1901
 1911
 1921
 1931
 1941
 1951
 1961
 1971
 1981
 1991
 2001

90 91 92 93

De façon particulière, des séquences de nucléotides de l'invention codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis comprennent ou sont constituées par l'enchaînement (III) défini précédemment.

L'enchaînement (III), compris dans la séquence de nucléotides de l'invention, contient 2711 nucléotides. Ce fragment comprend notamment le promoteur potentiel du gène de la δ -endotoxine active sur S.littoralis.

Entrent naturellement dans le cadre de la présente invention, des séquences de nucléotides modifiées par rapport aux enchaînements (I) ou (III) décrits ci-dessus, dans la mesure où ces modifications ne génèrent pas des variations sensibles de la toxicité du polypeptide codé par la séquence modifiée, vis-à-vis de S.littoralis.

Ces modifications peuvent par exemple consister en des délétions, substitutions, recombinaisons.

Ainsi les séquences de nucléotides (I) et (III) comportent en leur position 611 un nucléotide variable correspondant à l'adénine (A) dans la séquence (I) et à la cytosine (C) dans la séquence (III). Ces nucléotides entrent dans la composition des codons respectifs GAA et GCA qui codent respectivement pour les acides aminés acide glutamique (GLU) et alanine (ALA) dans les séquences respectives II et IV.

De même toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements (I) ou (III), telle qu'obtenue par transformation enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique entre également dans le cadre des définitions de l'invention.

La séquence de nucléotides de formule (III) commence par un codon d'initiation ATG situé en position 241 et qui représente le début d'une phase ouverte de

13

lecture de 2470 nucléotides.

L'invention concerne en outre une séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés ci-après :

5

10

15

20

25

30

35

PET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE

271

PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE SER LEU SER

281

LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL VAL THR GLY ILE VAL GLY PRO SER

431

GLN THR ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU

541

GLN LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU THR GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE

631

ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR

721

ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG THR GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU

811

ALA TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO CYS SER

901

THR TYR GLN ASP THR ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

991

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER
 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE
 THR ASP TRP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO
 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR
 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR GLY VAL VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN
 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG
 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

1901 ARG ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY SER ARG THR SER ARG THR ASP PHE SER ASN PRO PHE SER PHE
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 2101 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA THR THR ARG TYR GLU LEU ARG
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP
 2701 CYS SER CYS

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage comportant plus particulièrement au moins une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, en particulier au moins une
5 partie de la séquence d'environ 3kb.

Un vecteur recombinant particulier est par exemple un plasmide comprenant le fragment HindIII-PstI de la séquence de nucléotides de l'invention, inséré dans un vecteur pUC9. Un premier vecteur préféré est le plasmide pHT71 dont la construction est rapportée dans les
10 ensembles ci-après, qui comprend un fragment d'ADN HindIII-PstI selon l'invention constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

Un autre vecteur recombinant est constitué par le plasmide pHT 671 dont la construction est donnée dans
15 la figure 4. Ce plasmide comprend un fragment HindIII-PstI chimère, obtenu en fusionnant un fragment d'ADN HindIII-HindII de 1,1 kb provenant de la souche entomocidus 6-01 avec un fragment HincII-PstI de 1,9 kb
20 issu de la souche aizawai 7-29.

Entrent également dans le cadre de l'invention les souches bactériennes modifiées qui comportent l'une des séquences nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant d'expression et de clonage défini
25 précédemment, de préférence le plasmide pHT 671 ou le plasmide pHT71.

L'invention vise en outre un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, s'attaquant aux
30 feuilles de coton ou des autres cultures telles qu'énumérées ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

35 L'invention vise plus particulièrement la

partie NH_2 -terminale de ce polypeptide qui renferme l'activité larvicide.

L'extrémité de la partie NH_2 -terminale active répond à la séquence (II) d'acides aminés donnée ci-dessus.

Un polypeptide préféré de l'invention est celui qui répond à cette séquence (II) et répond à la séquence (IV) d'acides aminés donnée dans les pages précédentes. Ce polypeptide répondant à la séquence (IV) comprend 823 acides aminés. Sa masse moléculaire calculée est de 92906 Da.

Cette séquence de δ -endotoxine a été comparée aux séquences en acides aminés des δ -endotoxines provenant d'autres souches de B. thuringiensis actives sur les lépidoptères et dont les gènes ont été isolés et séquencés précédemment : il s'agit des δ -endotoxines des souches kurstaki HD1 (19), kurstaki HD73 (20), berliner 1715 (21) et (22) Sotto (23) et aizawai IPL7 (24).

Les résultats de ces comparaisons indiquent que toutes sont différentes dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620) alors que la partie NH_2 terminale (acides aminés 1 à 280) et le domaine COOH terminal (acides aminés 621 à 1175) de la protéine sont très conservés et ne diffèrent que par quelques acides aminés. En revanche la δ -endotoxine correspondant à la séquence (IV) ci-dessus présente des différences importantes avec les autres δ -endotoxines, aussi bien dans la partie NH_2 terminale (acides aminés 1 à 280) que dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620). Les résultats de ces comparaisons indiquent encore que la moitié NH_2 -terminale de la molécule (acides aminés 1 à 620) qui correspond à la fraction toxique de la protéine ne présente que 46% d'homologie avec les autres δ -endotoxines. Les différences les plus importantes se situent dans la seconde moitié de la partie toxique de la

molécule (acides aminés 281 à 620) avec seulement 36% d'acides aminés identiques, la partie NH₂-terminale (acides aminés 1 à 280) présentant quant à elle 58% d'acides aminés identiques avec les autres δ -endotoxines.

5 De telles différences importantes n'ont jamais été observées jusqu'à présent dans la partie NH₂-terminale de la fraction toxique de la molécule, parmi les δ -endotoxines actives sur les lépidoptères.

Pour obtenir une séquence de nucléotides entrant dans le cadre de l'invention, codant pour au moins
10 la partie active d'un polypeptide présentant une toxicité spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, on a recours, conformément à l'invention, aux étapes suivantes, à savoir :

15 - la réalisation d'une hybridation moléculaire entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis, et d'autre part au moins deux séquences de nucléotides, utilisées
20 comme sondes, provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène de δ -endotoxine de B.thuringiensis, cette partie codant pour la partie NH₂-terminale du polypeptide actif sur les larves de lépidoptères et de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du
25 polypeptide,

- l'isolement du fragment hybridé,
- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

De manière avantageuse, les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène de
30 δ -endotoxine provenant de la souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130 kDa, active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

Dans un mode de réalisation du procédé précédent,
35 dent, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de

clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant d'une unique souche de B.thuringiensis, de préférence aizawai 7.29. En particulier ce fragment est porté préférentiellement par le plasmide recombinant pHTA6 tel qu'isolé à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotides issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins deux souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif, de manière préférentielle, vis-à-vis de S.littoralis.

Dans ce cas, le fragment recombiné utilisé dans l'étape de clonage est un fragment de 3kb environ, élaboré avantageusement à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII d'environ 1,1kb provenant de la souche entomocidus 6.01 et d'un fragment HincII-PstI d'environ 1,9kb de la souche aizawai 7.29. Il correspond à un gène tronqué de δ -endotoxine.

Les fragments de restriction HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés plus spécialement par les plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6 tels qu'isolés à l'aide de la sonde constituée par le fragment PvuII dont question ci-dessus.

L'étude de la toxicité, vis-à-vis des larves de

l'épidoptères, des souches bactériennes modifiées à l'aide des séquences de nucléotides définies ci-dessus, a permis de mettre en évidence leur activité toxique élevée, notamment à l'égard des chenilles de S.littoralis.

5 Cette activité a été appréciée au regard de l'indice de spécificité correspondant au rapport
CL50 S.littoralis

CL50 P.brassicae

10 dans lequel "CL50" représente la concentration létale tuant 50% des larves en 72 heures.

L'utilisation d'un tel indice permet d'évaluer l'activité des souches bactériennes étudiées sans avoir à considérer le taux d'expression des polypeptides.

15 Les résultats obtenus, qui sont rapportés dans les exemples qui suivent, et les valeurs de DL 50 qui en sont déduites, ont montré que les souches bactériennes modifiées selon l'invention présentent une activité toxique vis-à-vis de S.littoralis plus spécifique que les
20 protéines de cristal natives des souches azawai 7-29 ou berliner 1715.

L'invention vise donc l'application, pour l'élaboration de compositions larvicides toxiques de préférence vis-à-vis de S.littoralis, de ces souches
25 modifiées, de vecteurs recombinants renfermant les séquences nucléotidiques définies plus haut, en particulier du plasmide pHT671 et du plasmide pHT71, et de ces séquences elles-mêmes.

30 Les compositions larvicides de l'invention sont alors caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace de polypeptides tels que définis ci-dessus ou exprimés par les séquences nucléotidiques évoquées plus haut.

35 Pour produire ces polypeptides on met avantageusement en oeuvre les gènes tronqués de δ -endotoxine

correspondant aux séquences nucléotidiques de l'invention.

Ces gènes peuvent être utilisés pour produire en excès le polypeptide toxique dans des microorganismes permettant l'expression des vecteurs recombinants ci-dessus. Des souches de microorganismes appropriées comprennent E.coli ou encore B.subtilis.

Ces gènes tronqués peuvent être réintroduits dans les souches de B.thuringiensis ou dans des espèces apparentées telle que B.cereus, selon les techniques classiques, par exemple, par transformation, conjugaison ou transduction. Ces techniques permettent de produire le polypeptide toxique en grande quantité sans avoir à modifier au préalable la région naturelle du promoteur des gènes de δ -endotoxine de B.thuringiensis.

Cette transformation peut être effectuée en utilisant des méthodes dérivées de la transformation des protoplastes de B.subtilis selon (11) ou des cellules végétatives de B.thuringiensis comme décrit dans (12).

L'introduction de plasmides recombinants par un système de type conjugaison, peut être réalisée en utilisant B.thuringiensis comme souche hôte et B.subtilis ou Streptococcus faecalis comme souches de type donneur, en opérant selon (13) et (14).

En variante, les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences. L'introduction peut être effectuée dans des microorganismes tels que Pseudomonas en opérant selon le procédé décrit dans (17), par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques contenant le transposon Tn5 et le gène de la toxine, ou Azospirillum ou Rhizobium par l'intermédiaire de vecteurs suicides dérivés du plasmide RP4 et de plasmides mobilisateurs fonctionnels chez les

bactéries gram négatives (pRK2013 par exemple) selon les procédés décrits dans (18).

Les gènes tronqués sont seuls dans les souches de Bacilli, ou en variante sont associés à différents gènes de δ -endotoxine ce qui permet d'obtenir des cristaux synthétisés par ces souches spécifiquement toxiques, vis-à-vis d'espèces données de Noctuelles, ou toxiques à la fois vis-à-vis des Noctuelles et d'insectes sensibles aux autres δ -endotoxines. Ces recombinaisons, effectuées in vitro ou in vivo avec les séquences nucléotidiques de l'invention et d'autres gènes de δ -endotoxines présentant des spécificités toxiques différentes, conduisent à la construction de nouveaux gènes codant pour de nouvelles protéines toxiques hybrides présentant un large spectre d'activité vis-à-vis des insectes. Ces nouveaux gènes et ces nouvelles protéines entrent également dans le cadre de l'invention.

Dans ces applications, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être transférées et exprimées dans des plantes sensibles à S.littoralis afin de diminuer les ravages causés par ces insectes.

Parmi les plantes à protéger, on citera : le coton, le trèfle, la tomate et la luzerne.

Le transfert du gène tronqué dans des plants de coton, peut être réalisé par transformation mettant en jeu des souches telles que Agrobacterium comme décrit dans (15).

L'invention concerne en outre les cellules végétales, les plantes et les graines renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Les cellules végétales selon l'invention sont des cellules dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que

définie ci-dessus. L'invention concerne également les cellules végétales issues de leur division.

Les plantes selon l'invention sont des plantes transformées par un procédé non essentiellement biologique, ayant en particulier pour prédateur S. littoralis, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S. littoralis. Il s'agit aussi de plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication ou de croisements hybrides.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des plantes ayant en particulier pour prédateur S. littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S. littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans leur génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

L'invention vise en outre des graines capables de donner une plante telle que définie ci-dessus ou issues d'une telle plante, caractérisées en ce qu'elles ont intégré dans leur génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotide décrite plus haut.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se reportant aux exemples dans lesquels :

- la figure 1 représente la carte de restriction des plasmides PHTA6 et PHTe6,
- la figure 2, la carte de restriction d'un gène d'une protéine de cristal de la souche aizawai 7.29 cloné dans le plasmide PHTA2 et définissant les fragments d'ADN qui sont utilisés comme sonde,
- la figure 3, présente le fragment de 6,6kb cloné dans

pHTA6 et le résultat d'une hybridation effectuée entre ce fragment et les sondes décrites dans la figure 2,

- la figure 4, la carte de restriction du plasmide pHT671, et

5 - la figure 5, les photographies de tests d'immunodiffusion.

Les expériences d'hybridation réalisées pour la mise en oeuvre de l'invention ont été effectuées à 42°C pendant 24 h. dans une solution contenant 5 x SSC, 30% de formamide et 1 Denhardt (7) en présence de la sonde ADN
10 marquée au ³²P. Les filtres sont lavés à 42°C, 20 mn, en utilisant successivement les solutions suivantes :
5 x SSC dans 30% de formamide, 5 x SSC, 2 x SSC, 1 x SSC et 0,5 x SSC avant séchage à température ambiante.

15

EXEMPLE I - Construction d'une séquence d'ADN de 3kb environ contenant un gène chimère d'une toxine insecticide

Cette construction comprend :

- 20 1/ la préparation de banques de gènes de B. thuringiensis
2/ la sélection et la caractérisation des clones transformants renfermant les gènes d'une protéine du cristal et des séquences nucléotidiques responsables de l'activité larvicide,
25 3/ recombinaison in vitro de ces séquences dans un vecteur de clonage avec construction du plasmide pHT671.

Ces différentes étapes sont réalisées comme suit :

1/ Préparation de banques de gènes de B. thuringiensis.

30 L'ADN total des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01 de Bacillus thuringiensis est purifié en utilisant la méthode rapportée dans (1) et 50µg de chaque ADN purifié sont complètement digérés avec l'enzyme de restriction PstI.

35

L'ADN digéré par PstI est analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et des fragments d'ADN d'une taille de 5 à 8 kb sont récupérés à partir des gels d'agarose, par électroélution, de la manière décrite dans (2).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche aizawai 7-29 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC18 digéré par PstI selon (3).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la chaîne entomocidus 6-01 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC9 digéré par PstI. Les cellules de E.coli JM83 sont transformées avec le mélange de ligature comme décrit dans (4).

Les clones transformants de E.coli sont sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

2/ Isolement et caractérisation des clones transformants contenant les gènes d'une protéine de cristal.

A/ Criblage des cellules de E.coli transformées à l'aide d'un fragment interne d'un gène de la protéine du cristal marqué au ³²P, utilisé comme sonde :

Des clones transformants contenant des plasmides recombinants portant le gène du cristal sont détectés par hybridation sur colonies, suivant la méthode décrite dans (5), en utilisant comme sonde un fragment PvuII de 2 kb du plasmide pBT 15-88 correspondant à une partie interne du gène de la protéine du cristal, situé sur le chromosome de la souche berliner 1715.

B/ Caractérisation des plasmides recombinants présents dans les clones qui réagissent avec la sonde ci-dessus.

Deux plasmides recombinants, pHTA6 et pHTE6, isolés respectivement des banques de gènes construites à

partir des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, présentent une homologie avec cette sonde. Dans chaque cas, un fragment d'ADN d'environ 6,6 kb a été cloné.

La carte de restriction des deux plasmides est donnée sur la figure 1. La comparaison des sites de restriction montre que les deux fragments d'ADN clonés semblent identiques.

Afin de délimiter les séquences correspondant au gène de la δ -endotoxine, différents fragments d'ADN marqués au ^{32}P , provenant d'un gène du cristal précédemment caractérisé, et cloné dans le plasmide recombinant pHTA2, sont utilisés comme sondes. Ce dernier gène du cristal également originaire de la souche aizawai 7-29 code pour une protéine de 130 kd active contre P. bras-
sicae mais pas contre S. littoralis. Ce type de gène possède la même carte de restriction que le gène de la δ -endotoxine issu de la souche berliner 1715. Sur la figure 2, on a rapporté la carte de restriction de ce gène de la protéine du cristal de la souche de aizawai 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2. Les traits épais indiqués au-dessus de la carte correspondent aux fragments utilisés comme sondes d'hybridation.

Les plasmides pHTA6 et pHTE6 sont hydrolysés par différentes endonucléases de restriction, analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et hybridés avec les différentes sondes.

Le transfert de l'ADN sur des filtres de nitrocellulose est réalisé suivant la méthode de SOUTHERN décrite dans (6). L'hybridation est conduite à 42°C pendant 24 heures dans une solution contenant : 5X SSC, 30% de formamide et un mélange 1X Denhardt décrit dans (7) en présence d'une sonde d'ADN marquée au ^{32}P . Les filtres sont ensuite lavés à 42°C pendant 20 minutes, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 SSC dans 50% de formamide, 5 SSC, 2 SSC, 1 SSC et 0,5 SSC

avant d'être séchés à la température ambiante.

Les résultats de ces expériences d'hybridation sont résumés sur la figure 3. Il apparaît que chaque extrémité des fragments d'ADN de 6,6 kb clonés présente une homologie avec les sondes. Le fragment PstI-KpnI de 1,5 kb réagissant avec la sonde n° 3 correspond à l'extrémité 3' d'un gène de la protéine du cristal présent à la fois dans les souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01. Comme il est indiqué sur la figure 3, les sondes n° 1 et n° 2 correspondant à l'extrémité 5' du gène de la δ -endotoxine de pHTA2, s'hybrident avec le fragment HindIII-HincII de 1,1 kb contenu dans le plasmide pHTA6. La sonde n° 3 qui couvre l'extrémité 3' du gène de la δ -endotoxine de pHTA2, s'hybride avec le fragment HindIII-PstI de 0,4kb contenu dans le plasmide pHTA6. Il doit être noté qu'un faible signal d'hybridation est obtenu avec la sonde n° 2 alors que les deux autres sondes donnent des signaux facilement détectables.

A partir de ces résultats, les inventeurs ont établi que le fragment d'ADN HindIII-PstI de 3 kb correspond à une grande partie d'un gène de la δ -endotoxine qui commence près du site HindIII central. Il apparaît clairement au vu des résultats des expériences d'hybridation que le gène de la δ -endotoxine présente des différences substantielles avec ceux caractérisés dans l'art antérieur. Sur la base de ces résultats il a été décidé de cloner le fragment de 3 kb HindIII-PstI dans le vecteur pUC9.

3/ Construction du plasmide pHT 671 contenant un gène chimère de la toxine insecticide reconstitué.

Le fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb issu du plasmide pHT6 et le fragment d'ADN HincII-PstI de 1,9kb issu du plasmide pHTA6 sont purifiés sur gels d'agarose.

Des quantités égales des deux fragments d'ADN purifiés et de l'ADN de pUC9 digéré avec HindIII et PstI sont mélangées et ligaturées. Le mélange de ligature est utilisé pour transformer des cellules compétentes de E. coli JM83, puis les cellules transformées de E. coli sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline. L'un des clones recombinants intéressant examiné contient un plasmide désigné par pHT671, dont la carte de restriction a été déterminée et est représentée sur la figure 4. Ce plasmide (pHT671) contient un fragment d'ADN de 3 kb inséré dans le vecteur pUC9. Cette séquence d'ADN a la même carte de restriction que les fragments HindIII-PstI de 3 kb contenus dans les plasmides pHTA6 et pHTE6, mais correspond à une molécule d'ADN reconstituée construite par recombinaison in vitro à partir de séquences d'ADN provenant des souches aizawai 7-29 d'une part et entomocidus 6-01 d'autre part.

EXEMPLE II : Etude de la séquence nucléotidique de la région du promoteur et de la région codant pour la partie NH₂ terminale de la δ -endotoxine active contre les Noctuidae.

Le fragment HindIII-HincII de pHT671 est séquencé conformément à la méthode décrite dans (8) en utilisant un système M13. Pour obtenir des fragments d'ADN clonés se chevauchant partiellement qui seront utilisés dans le séquençage de l'ADN, on a recours à la méthode de sous-clonage par délétion dans M13, développée par DALE et al (9).

La séquence de 940 nucléotides du fragment HindIII-HincII qui est d'une longueur d'environ 1 kilobase correspond à l'enchaînement I ci-dessus.

L'analyse de cette séquence montre que la plus grande phase ouverte de lecture commence à la position 241 et qu'un site potentiel de liaison aux ribosomes GGAGG se trouve six paires de base en amont de ce codon

ATG (position 230 à 235). La région localisée entre les nucléotides 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon ATG) est fortement homologue à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) séquencée par WONG et al (1983) et décrite dans (16) et dont les auteurs ont montré qu'elle contient trois promoteurs BtI, BtII, et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement. La comparaison entre les séquences en acides aminés déduites des 750 premiers nucléotides des gènes de BTK et pHT671, montre que ces polypeptides présentent des différences significatives au niveau de la moitié N-terminale de la partie active issue de la protoxine (seulement 66% d'homologie stricte). Il est important de noter que c'est la première fois qu'un gène de la δ -endotoxine isolé à partir d'une souche active contre les lépidoptères code pour un polypeptide qui présente des différences substantielles dans cette région. En effet, ce domaine N-terminal apparaît fortement conservé (plus de 97% d'homologie stricte) parmi tous les gènes du cristal actifs sur lépidoptères qui ont été séquencés jusqu'à présent. Par ailleurs, les inventeurs ont montré que le taux de variabilité est du même ordre si l'on considère les séquences nucléotidiques de pHT671 et des autres gènes de type lépidoptères.

EXEMPLE III : Construction d'une séquence d'ADN de 2,7kb environ contenant un gène d'une toxine larvicide.

Pour réaliser cette construction on a utilisé l'ADN de la souche aizawai 7.29 de B.thuringiensis jusqu'à l'étape de réalisation du plasmide pHTA6 telle que décrite dans l'exemple I.

Le fragment HindIII-PstI d'environ 2,7kb obtenu à partir du plasmide pHTA6 a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC9, préalablement hydrolysé par les enzymes de restriction HindIII-PstI, pour donner le plasmide pHT71.

EXEMPLE IV : Etude de la séquence de nucléotides constituant le plasmide pHT71 codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

5 Le fragment HindIII-Pst-I de 2,7kb de pHTA6, qui a été sous-cloné dans pHT71, a été séquencé par la technique de Sanger et al.(8) en utilisant le phage M13mp19 et le système de sous-clonage par délétions développé par Dale et al.(9). Ce système permet d'obtenir
10 des phages M13 contenant une série de fragments d'ADN se chevauchant partiellement et qui peuvent être utilisés pour le séquençage de l'ADN.

La séquence de nucléotides de ce fragment de 2,7kb qui correspond à l'enchainement (III) donné ci-
15 dessus, a été déterminée sur les 2 brins d'ADN, exception faite des 212 derniers nucléotides (position 2500 à 2711) qui n'ont été séquencés que sur 1 seul brin.

La séquence nucléotidique de ce fragment Hind-III-PstI a une longueur de 2711 nucléotides. Ce
20 fragment contient le promoteur potentiel ainsi que la plus grande partie du gène de la δ -endotoxine active sur S.littoralis.

EXEMPLE V : Etude de la toxicité spécifique des clones recombinants de E.coli JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) contre S.littoralis.

25 La toxicité des clones recombinants de E.coli JM83 contenant pHT671 et de E.coli JM83 contenant pHT71 a été déterminée par des tests biologiques sur des chenilles de l'espèce P.brassicae et S.littoralis comme décrit par LECADET et MARTOURET dans (10). Les résultats ont été comparés avec la toxicité spécifique des protéines de cristal natives et purifiées à partir des souches berliner 1715 et aizawai 7-29 entomocidus 6.01 B.cereus 569 (contenant le plasmide pBT45, pAM β 1) contre
35 les deux espèces d'insectes. La toxicité spécifique du clone recombinant et des souches de B.thuringiensis est

32

exprimée en termes d'"indice de spécificité" défini précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 1 ci-après.

- 5 Dans ce tableau, pour des souches de E.coli, la concentration 1 correspond à une culture bactérienne de 14 heures concentrée 20 fois, désintégrée par ultrasons ; pour les souches de B.thuringiensis la concentration est exprimée en μg de protéine cristal par μl de préparation.
- 10 L'activité toxique des préparations a été testée par ingestion forcée sur des chenilles au cinquième stade de développement avec 5 μl de préparation, ou par une technique d'ingestion libre en utilisant des larves au deuxième stade de développement.

15

20

25

30

35

TABLEAU 1

Toxicité comparée d'un clone recombinant et de deux souches de B.thuringiensis vis-à-vis de S.littoralis et P.brassicae.

5	Souches et plasmides	S.littoralis		P.brassicae	Indice de spécificité CL50 <u>S.littoralis</u> CL50 <u>P.brassicae</u>
		CL50 2ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	
10	JM83 (pUC18)	> 1	> 1	> 1	-
	JM83 (pHT671)	0,04	0,13	0,72	0,2
	JM83 (pHTA2)	> 1	> 1	0,03	> 30
15	JM83 (pHTA4)	> 1	> 1	> 1	-
	JM83 (pHT71)	ND	0,5	> 1	< 0,5
	berliner 1715 cristaux natifs	ND	0,11	0,007	15,7
20	aizawai 7.29 cristaux natifs	ND	0,02	0,04	0,5
	entomocidus 601 cristaux natifs	ND	0,028	0,012	2,3
25	B.cereus 569 (pBT45,pAM β 1)	ND	0,38	0,054	7

L'examen des valeurs de CL50 résumées dans ce tableau 1 montre que les extraits de protéine des clones recombinants JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont préférentiellement toxiques contre S.littoralis. En second lieu une comparaison des valeurs de l'indice de spécificité montre que l'activité larvicide des clones recombinants est plus spécifique à raison de 2,5 fois envers S.littoralis que les protéines du cristal natives de la souche aizawai. Par ailleurs, les clones recombinants de JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont très actifs contre un autre insecte de la famille des Noctuidae, Mamestra brassicae (pour le clone JM83 (pHT671) par exemple, la valeur CL50 est de 0,02, en utilisant des larves du deuxième stade de développement).

Ces deux résultats montrent que le gène de la toxine larvicide construit et cloné dans les plasmides pHT671 et pHT71 code pour une protéine spécifiquement active contre S.littoralis.

D'autres préparations obtenues à partir de clones recombinants contenant des plasmides portant des gènes codant pour d'autres types de δ -endotoxines (pHTA2 et pHTA4) ne sont pas actives sur S.littoralis : on peut voir que le plasmide pHTA2 code pour une δ -endotoxine spécifiquement active sur P.brassicae alors que le plasmide pHTA4 code pour une δ -endotoxine dont l'insecte cible n'a pas encore été identifié. On peut également voir que les inclusions cristallines produites par une souche de Bacillus cereus qui a reçu le plasmide pBT45, un des plasmides de la souche aizawai 7.29 qui porte aussi un gène de δ -endotoxine (le gène d'origine plasmidique de la souche aizawai 7.29), sont également spécifiquement actives sur P.brassicae.

Des résultats similaires sont obtenus en utilisant, à la place des extraits bactériens bruts, des extraits protéiques solubles préparés à partir de

différents clones recombinants de E.coli.

Sur la base des valeurs de la CL50 rapportées dans le tableau ci-dessus et d'un poids individuel moyen de 41 mg par larve L5 (cinquième stade larvaire) de S.littoralis, la valeur de la DL50 a été estimée à 2,4 µg/gramme de larve pour les cristaux natifs de la souche aizawai 7-29.

Sur ces mêmes bases et sur la base de facteurs d'équivalence permettant de passer de la masse bactérienne totale à la quantité de protéines spécifiques (2% environ des protéines totales chez E.coli JM83 (pHT671), la DL50 correspondant à la toxine produite par l'expression chez E.coli JM83 du gène selon l'invention cloné dans le plasmide pHT671, a été déterminée et estimée à une valeur proche de 5,5 à 6 µg/gramme de larve.

Sur ces mêmes bases et après détermination de la CL50 d'extraits protéiques solubles préparés à partir de cultures broyées de E.coli JM83 (pHT671), la valeur de la DL50 correspondant à la toxine présente dans ces extraits a été estimée à 4,15 µg/gramme de larve.

Dans les deux cas et particulièrement dans le cas des broyats de E.coli, les valeurs de DL50 calculées sont approximatives et supérieures à celle des cristaux natifs, puisqu'il ne s'agit pas de toxine purifiée. Cependant ces données indiquent sans ambiguïté que le gène exprimé par pHT671 détermine une δ-endotoxine présentant la spécificité vis-à-vis de S.littoralis. En effet, le même type d'estimation réalisé avec des extraits de E.coli JM83 (pHTA2) portant un gène de δ-endotoxine de spécificité différente conduit à des valeurs 30 à 50 fois supérieures de la DL50 des extraits solubles, vis-à-vis de S.littoralis (135 à 350 µg/gramme de larve).

Les données qui précèdent permettront aisément à l'homme de l'art d'élaborer des compositions larvicides

36

actives avec les protéines de l'invention.

D'autres expériences de toxicité ont été réalisées en utilisant des larves au deuxième stade larvaire de M.brassicae, S.frugiperda et S.littoralis.

5 Les résultats obtenus, exprimés en termes de LC 50 comme défini pour le tableau 1, sont donnés dans le tableau 2.

10

15

20

25

30

35

TABLEAU 2
 ACTIVITE DES CLONES RECOMBINANTS
 CONTRE LES LARVES D'INSECTES
 DE LA FAMILLE DES NOCTUIDAE
M. BRASSICAE, S. FRUGIPERDA AND S. LITTORALIS

SOUCHES ET PLASMIDES	LARVE D'INSECTE ET STADE	M. BRASSICAE			S. FRUGIPERDA		S. LITTORALIS	
		CL50 2ème STADE			CL50 2ème STADE		CL50 2ème STADE	
JM 83 (pUC18)		NT		NT	NT		NT	
JM 83 (pHTA2)		> 1		0,51	0,9		0,9	
JM 83 (pHT671)		0,02		0,5	0,03		0,03	
JM 83 (pHT71)		ND		ND	0,03		0,03	
JM 83 (pHTA4)		> 1		0,54	> 1		> 1	

Il ressort de l'examen du tableau 2 que les extraits bactériens bruts du clone recombinant JM83 (pHT671) sont toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis (les valeurs de CL50 sont respectivement de 0,02 et 0,03) et faiblement toxiques vis-à-vis de S.frugiperda (CL50 de 0,5).

Les extraits du clone recombinant E.coli JM83 (pHTA2) sont faiblement actifs à l'égard de S.frugiperda et de S.littoralis et pas du tout toxique à l'égard de M.brassicae. Les extraits du clone recombinant JM83 (pHTA4) ne sont pas toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis et sont faiblement toxiques à l'égard de S.frugiperda.

Ces résultats confirment la forte toxicité spécifique des protéines obtenues à partir de pHT71 et de pHT671 à l'égard de S.littoralis et montrent que cette classe de protéine de cristal est aussi très active à l'égard de M.brassicae.

EXEMPLE VI : Etude de la spécificité des polypeptides exprimés par les clones formés par introduction des plasmides pHT671 et pHT71 dans E.coli.

Cette étude a été réalisée grâce à des tests d'immuno-diffusion. Les résultats sont rapportés sur la figure 5 (qui comprend les figures 5A et 5B).

La mise en oeuvre de l'expérience d'immuno-diffusion a été réalisée conformément au protocole suivant :

Des extraits solubles de protéines de clones E.coli contenant les plasmides pHT671, pHTA4, pHTA2 ou pHT71, pUC18 ont été placés respectivement dans les puits n° 2, 3, 4, 5, 6. Un échantillon d'un cristal purifié solubilisé de aizawai 7-29 a été placé dans le puits n° 1 afin de servir de contrôle positif.

Dans le test rapporté sur la figure 5A un

antisérum contre toutes les δ -endotoxines de aizawai 7.29, contenant des anticorps de lapin dirigés contre les protéines du cristal solubilisées a été utilisé et placé dans le puits central.

5 Une ligne d'immunoprécipitation a été observée dans tous les cas excepté dans le cas de l'extrait de E.coli contenant le vecteur plasmidique seul (puits n° 6).

10 On a remarqué que les lignes d'immunoprécipitation issues des puits n° 4 et n° 5 croisent, ce qui montre que les produits codés par les plasmides pHTA2 et pHT71 respectivement présentent des déterminants antigéniques différents.

15 Dans le test rapporté sur la figure 5B, l'antisérum utilisé contenait des anticorps polyclonaux de lapin contre les protéines du cristal de berliner 1715.

20 Une ligne d'immunoprécipitation a été observée avec les extraits de E.coli JM83 (pHTA4) (puits n° 3) JM83 (pHTA2) (puits n° 4). En revanche les clones E.coli JM83 (pHT71) (puits n° 5) JM83 (pHT671) (puits n° 2) ou JM83 (pUC9) (puits n° 6) ne donnent pas d'immunoprécipitation.

25 On peut en déduire que les gènes du cristal isolés dans pHTA4 et pHTA2 expriment des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de berliner 1715, souche qui n'est pas spécifiquement active vis-à-vis de S.littoralis.

30 En revanche, les extraits bruts de E.coli contenant les plasmides pHT671 et pHT71 contiennent des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de la souche aizawai 7.29, qui ne sont pas liés sur le plan immunogène avec les protéines du cristal de la souche berliner 1715.

35 Ces résultats confirment ceux donnés précédemment en rapport avec la spécificité des gènes isolés dans

les plasmides pHT71 et pHT671.

Des essais de précipitation antigène-anticorps ont permis de déterminer le niveau d'expression des gènes de δ -endotoxine dans différents clones recombinants.

5 Les résultats obtenus ont montré que la protéine du cristal représente entre 7 et 10% de protéines cellulaires totales de E.coli JM83 (pHTA2), entre 2 et 3% dans E.coli JM83 (pHT671) et entre 0,5 et 1% dans E.coli JM83 (pHTA4) et E.coli, JM83 (pHT71).

10

15

20

25

30

35

Les références bibliographiques dont il est question dans les exemples sont les suivantes :

- 5 (1) Klier, A.F., LECADET, M-M. and DEJONDER, R., 1973, Sequential modifications of RNA polymerase during sporogenesis in Bacillus thuringiensis, Eur. J. Biochem., 36 : 317-327.
- (2) MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York
- 10 (3) VIEIRA, J. and MESSING, J., 1982, The pUC plasmids, and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, Gene, 19 : 259-268.
- 15 (4) LEDERBERG, E.M. and COHEN, S.N., 1974, Transformation of Salmonella thyphimurium by plasmid deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol., 119 : 1072-1074.
- (5) GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D.S., 1975, Colony hybridization, a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,
20 72 : 3961-3965.
- (6) SOUTHERN, E.M., 1975, Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Molec. Biol., 98, 503-517.
- 25 (7) DENHARDT, D.T. 1976, A membrane filter taking for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm., 23 : 641-646.
- (8) SANGER, F., NICKLENS, S. and COULSON, A.R., 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 5463-5467.
- 30 (9) DALE et al. (1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA, Plasmid 1985, 13 : 31-40
- (10) LECADET, M.M. et MARTOURET D. 1987, Host specificity of
35 the Bacillus thuringiensis δ -endotoxin toward

Lepidopteran species : Spodoptera littoralis Bdv and Pieris brassicae L, J. of Invert. Pathol., 49 (n° 1) : 37-48.

- 5 (11)CHANG et al., 1979, High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA- Mol Gen Genet 168:111 115
- (12)HEIERSON et al., 1987, Transformation of vegetative cells of Bacillus thuringiensis by plasmid DNA, Journal of Bacteriology, Mar.1987, p.1147-1152,
- 10 (13)KLIER et al., 1983, Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes, Mol Gen Genet (1983) 191:257 262
- (14)LERECLUS et al., 1983, Isolation of a DNA, sequence related to several plasmids from Bacillus thuringiensis after a mating involving the Streptococcus faecalis plasmid pAMP¹, Mol Gen Genet (1983) 191:307-313
- 15 (15)UMBECK et al., 1987, Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum L.) plants - Biotechnology vol.5 March 1987.
- 20 (16)WONG et al., 1983, transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. of Biol. Chem., 258 : 1960-1967.
- (17)OBUKOWICZ M. et al (1986). Tn⁵ mediated integration of the δ -endotoxin gene from B. thuringiensis into the chromosome of root colonizing Pseudomonas. J. Bacteriol., 25 168, 982-989.
- (18)SIMON, R. et al, (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology, 1, 30 pp. 784-791.
- (19)Schnepf et al, (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J BIOL Chem 260 : 6264-6372.
- (20)Adang et al, (1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of 35

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36 : 289-300.

(21)Wabiko et al,(1986) Bacillus thuringiensis entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis.

5 DNA 5 : 305-314.

(22)Hofte et al,(1986) Structural and functional analysis of a cloned δ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis berliner 1715. Eur J Biochem 161 : 273-280.

10 (23)Shibano et al,(1986) Complete structure of an insecticidal crystal protein gene from Bacillus thuringiensis. In : Bacillus molecular genetics and biotechnology applications. J.Ganesan, A.T., Hoch, J.A.(eds). Academic Press 307-320.

15 (24)Oeda et al,(1987) Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of Bacillus thuringiensis strain aizawai IPL7 and its high-level expression in Escherichia coli. Gene 53 : 113-119.

20

25

30

35

REVENDICATIONS

- 1/ Séquence de nucléotides codant pour au moins
5 une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S.littoralis.
10 2/ Séquence de nucléotides de 3 kb environ correspondant au fragment de restriction HindIII-PstI provenant de B.thuringiensis capable de s'hybrider avec les sondes 1, 2, 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2.
- 15 3/ Séquence selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comporte des sites dans l'ordre suivant :
Hind III - Hinc II - Bgl II - Kpn I - Hind III - Pst I -
4/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque
20 des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue in vitro à partir d'une souche unique de B.thuringiensis.
- 5/ Séquence de nucléotides selon la revendication 4, caractérisée en ce que la souche de B.thuringiensis
25 est la souche aizawai 7.29.
- 6/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN de deux souches différentes de B.thuringiensis.
- 30 7/ Séquence selon la revendication 6, caractérisée en ce que les 2 souches de B.thuringiensis correspondent respectivement aux souches entomocidus 6-01 et aizawai 7-29.
- 8/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce
35 qu'elle code pour un polypeptide capable de former un

45

complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S. littoralis.

9/ Séquence de nucléotides caractérisée en ce
5 qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

10

15

20

25

30

35

52
GTC TAC TTG ACA GGG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GGG GCA TAT ATT CAT
112
ATT TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA ACA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
172
TCC TGG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA ATA AAA AAA CGG
232
ACG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT
292
CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT
352
TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GCG GGA GGA TTT TTA GTT
412
CGA TTA ATA GAT TTT GTA TGG GGA ATA GTT GCG CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA CTA
472
CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT ACG AAT GCT GCT ATT GCT
532
AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTG GAA GCA TTT AAA GAA TGG CAA
592
GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT GGT ATA CTT GAT
652
GGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA
712
TCC GTT TAT GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT
772
CGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACG
832
CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT CAC TGT GCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA
892
CCC AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CGG AGA GAC TTA ACA TTG
952
ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC

cu à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement
suivant :

[illegible]

[illegible]

979 391 331 191

10/ Séquence de nucléotides codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement (I) ou (III) défini à la revendication 9.

11/ Séquence de nucléotides selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle présente un codon d'initiation ATG situé en position 241.

10 12/ Séquence selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée par un site de liaison aux ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

13/ Séquence selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence comprise entre les nucléotides en position 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon d'initiation ATG) qui est homologue à raison d'environ au moins 70% à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki-HD1 Dipel (BTK) qui contient les trois promoteurs BtI, BTII et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement.

14/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (II) d'acides aminés ci-après :

25

30

35

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN
PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE
SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL
GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL
GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA
ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU
GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP
GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU
SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE
GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG
HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU
PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU
THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

ou qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV)
d'acides aminés ci-après :

52

271 MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE
 281 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER ILE ASP ILE SER LEU SER
 301 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER
 321 GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU
 341 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE
 361 ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR
 381 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR ILE ASN VAL ASN GLU
 401 TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER
 421 THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

331

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER
1061 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE
1171 THR ASP TRP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO
1261 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG
1331 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY VAL GLU PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR
1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS
1521 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN
1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE
1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG
1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

1134 PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR TAA ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE
 1201 PHE ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN
 2101 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP
 2701 CYS SER CYS

15/ Vecteur recombinant d'expression et de clonage comportant au moins une partie de la séquence nucléotidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14.

5 16/ Plasmide selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il s'agit de pHT671 tel que représenté sur la figure 4, ou de pHT71 comprenant un fragment d'ADN HindIII-PstI constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

10 17/ Souches bactériennes modifiées, caractérisées en ce qu'après transformation elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 14.

18/ Souche bactérienne selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un vecteur recombinant selon la revendication 15 ou 16,

19/ Polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

20/ Polypeptide selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (II) ou la séquence (IV) d'acides aminés définies dans la revendication 14.

21/ Procédé d'obtention d'une séquence nucléotidique codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé par les étapes suivantes :

- la réalisation d'une hybridation entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis

active contre S.littoralis et d'autre part, une ou plusieurs séquences de nucléotides utilisées comme sondes provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène d'une δ -endotoxine de B.thuringiensis cette
5 partie codant pour la partie N-terminale d'un polypeptide toxique vis-à-vis des lépidoptères et provenant de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,

- l'isolement du fragment,

10 - son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

22/ Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène d'une δ -endotoxine provenant d'une souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de
15 130kDa active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

23/ Procédé selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans
20 l'étape de clonage est élaboré à partir d'au moins une séquence de nucléotides issue d'au moins un vecteur recombinant contenant une séquence de nucléotides d'au moins une souche de B.thuringiensis.

24/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape
25 de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins 2 souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des
30 séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis.

25/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape
35

de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant de la souche aizawai 7.29.

26/ Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment de restriction HincII-PstI provenant de la souche aizawai 7-29.

27/ Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le fragment de restriction recombiné selon la revendication 25 est porté préférentiellement par un plasmide pHTA6 et les fragments de restriction recombinés selon la revendication 26, HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés préférentiellement par les plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6, lesdits plasmides pHTA6 et pHTE6 étant tels qu'isolés à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotidiques issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

28/ Composition larvicide à activité préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace de polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 19 à 20 exprimé par les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 14, le vecteur selon la revendication 15, ou le plasmide selon la revendication 16, ou la souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18.

29/ Application des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour produire

un polypeptide toxique vis-à-vis de lépidoptères, de préférence S.littoralis, dans des microorganismes capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences tels que E.coli, B.subtilis, B.cereus ou B.thuringiensis.

30/ Application selon la revendication 29, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes, tels que Pseudomonas, Azospirillum ou Rhizobium et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences.

31/ Application selon la revendication 29 ou 30, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes en association avec différents gènes de δ -endotoxine.

32/ Application des séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 à la transformation des plantes sensibles à S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend le transfert et l'expression de ces séquences dans ces plantes.

33/ Cellules végétales dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14 et, cellules issues de leur division.

34/ Plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, transformées par un procédé non essentiellement biologique, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis et,

plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication, ou de croisements hybrides.

35/ Plante ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères
5 génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans son génome par manipulation
10 génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

36/ Graine capable de donner une plante selon la revendication 34 ou 35 ou issue d'une telle plante, caractérisée en ce qu'elle a intégré dans son génome, par
15 manipulation génétique une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

20

25

30

35